

《疾病监测》审稿意见与作者答复

题目：弥散粘附性大肠埃希菌多重 PCR 检测方法的建立及其在 389 例感染性腹泻患者中的流行情况

作者：阳波; 张网; 白向宁; 许彦梅; 熊衍文; 罗成旺

——审稿专家意见与答复——

专家审稿意见及作者修改说明：

1. 因 HEp-2 细胞“弥散粘附”实验目前被认为是检测 DAEC 的“金标准”，该研究是否对检出的 24 株 DAEC 菌株进行了 HEp-2 细胞“弥散粘附”实验？两种实验的检测结果是否吻合？

DAEC 在我国感染性腹泻中的作用及与其流行情况目前尚无调查研究。虽然 DAEC 在最初是根据对 HEp-2 细胞的粘附表型来定义的，但在实际检测工作中不具有可操作性。根据 DAEC 大多数菌株都具有 *afa/dr* 粘附基因簇的特点，国外有针对基因簇中不同靶基因的 PCR 检测方法，但是由于不同靶基因的序列保守性不同，造成针对不同靶基因的 PCR 方法检出率会有差异。本研究的一个重要出发点，就是比较 *afa/dr* 基因簇中不同基因作为诊断靶基因的优缺点，筛选合适的诊断靶基因。

在前期工作中，根据细胞粘附实验，我们筛选到 3 株(DA07、DA60 和 DA119)对 HEp-2 细胞具有弥散粘附特征的菌株，并且对其粘附基因簇进行了测序分析。从粘附特点和粘附基因的序列，这 3 株菌均完全符合 DEAC 的定义，作为我们后续分析的参考菌株。我们对这 3 株菌的 *afa/dr* 粘附基因簇以及 GenBank 中所有的 DAEC *afa/dr* 粘附基因簇进行了序列比较分析，并针对基因簇中不同的基因设计了相应的引物，评价了不同引物的检测结果。

根据建立的 PCR 方法，目前从 389 份标本中筛选到基因阳性的 24 菌株，对于这 24 株菌并没有再进一步反过来做细胞粘附分析，尚不知道粘附基因阳性与细胞弥散粘附表型的相关性。在后续的 DAEC 研究中，我们会进行更深入的分析，包括细胞粘附，其他毒力基因的携带情况以及致病机制等。

2. 有关这 24 株菌感染者的临床症状与流行病学特征是什么？是否都是儿

童病例？该信息可为后续在何种人群进行 DAEC 检测提供参考。

在修改稿中，我们增加了一张表格，详细列举了这 24 例标本的特征。这 24 例病例均为散发病例，以 5 岁以下儿童为主，临床特征以脓血便居多。

定稿会意见与答复

定稿会意见：

多重 PCR 增加该菌在样品检出率方面有一定意义，但选取靶基因的理论 and 实验证据论述不足，实验条件优化不足，建立方法验证用样品数量和种类少，无模拟或实际样品，而直接检测了未知腹泻患者标本，缺乏已知阳性或阴性参照样品。

大肠埃希菌广泛存在于温血动物肠道和环境中，其中部分带有特殊毒力基因的大肠埃希菌可引起腹泻，称为致泻性大肠埃希菌。根据毒力因子、致病机理和流行病学等特征，目前认识比较清楚的包括肠致病性大肠埃希菌（enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC）、肠产毒性大肠埃希菌（enterotoxigenic *E.coli*, ETEC）、肠出血性大肠埃希菌（enterohemorrhagic *E.coli*, EHEC）、肠侵袭性大肠埃希菌（enteroinvasive *E.coli*, EIEC）以及肠集聚性大肠埃希菌（enteroaggregative *E.coli*, EAEC）。关于近年来提出的 DAEC，在本文的前言和讨论中均有论述。这些种类致泻性大肠埃希菌的鉴定，依赖的是特定的毒力基因。

多重 PCR 增加该菌在样品检出率方面有一定意义，

多重 PCR 在致泻性大肠杆菌种类中的鉴定中是决定性的作用，而不是增加样品的检测率。本研究就探讨了建立这种菌株建立方法的问题。

但选取靶基因的理论 and 实验证据论述不足，

本研究选择的靶基因，是目前公认的 DAEC 菌株所含有的，反映了目前的认识水平，并且部分基因在既往的研究中被采用。

实验条件优化不足，

本研究对 PCR 引物设计、PCR 体系等进行了全面系统的优化。

建立方法验证用样品数量和种类少，无模拟或实际样品，而直接检测了未知腹泻患者标本，缺乏已知阳性或阴性参照样品。

本研究鉴定的多重 PCR 方法，对肠道常见的 25 种细菌及其他大肠埃希菌 229 株进行了评价；

本研究同时对 3 株背景清楚的 DAEC 菌株进行了检测。同时将这 3 株菌作为阳性参考。

修改意见：思路修改为多重 PCR 用于检测 389 例腹泻病患者弥散粘附性大肠埃希氏菌的分布情况，增加样品检出率？

对于不同种类致泻性大肠埃希菌的鉴定，均是基于关键毒力基因的检测。因此，建立基于关键基因的 PCR 方法检测 DAEC 是分析样品的基础。在此基础上，我们对我国从未认识过的腹泻患者粪便标本的 DAEC 的流行情况进行了检测。引起腹泻的因素是复杂的，也可能是多病原的协同作用，目前的数据尚不能判断 DAEC 在引起腹泻的作用。

根据定稿会专家的意见，将论文题目修改为：弥散粘附性大肠埃希菌多重 PCR 检测方法的建立及其在 389 例感染性腹泻患者中的流行情况

本文经这次修改后，基本达到要求，可以发表，谢谢！